ISOLIERUNG UND ANALYSE EINES PEPTIDS AUS DEM KALBSMYOKARD MIT HILFE DER HOCHSPANNUNGS-ELEKTROPHORESE, DER GELFILTRATION UND DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Hubertus-Benedictus Enzler

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546015_0061

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

ISOLIERUNG UND ANALYSE EINES PEPTIDS AUS DEM KALBSMYOKARD MIT HILFE DER HOCHSPANNUNGSELEKTROPHORESE, DER GELFILTRATION UND DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hubertus-Benedictus Enzler

München

1972

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Herbert Nowy
Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Seitz
Dekan: Prof.Dr.med.W.Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 21.November 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

M E I N E N E L T E R N

I Einleitung

II Methodik

1. Gewinnung des Materials
2. Trennungsmethoden und Apparaturen
   a. Hochspannungselektrophorese
   b. Dünnschichtchromatographie
   c. Gelfiltration
3. Bereitung der Pherogramme
4. verwendete Puffer
5. Färbemethoden
6. Eluationsvorgang
7. Hydrolyse

III Ergebnis

1. Charakter der untersuchten Verbindung
2. Lage von Peptid H im Gesamtextrakt nach der hochspannungs-elektrophoretischen Trennung
3. Isolierung des Peptid H aus dem Gesamtextrakt
4. Reindarstellung von Peptid H
5. Analyse des Peptid H - Hydrolysates
   a. Überprüfung des Hydrolysates bei einem Puffer von pH=1,9
   b. Überprüfung des Hydrolysates bei einem Puffer von pH=3,6
   c. Analyse mit Hilfe der Dünnschichtchromatochraphie
   d. Endergebnis der Untersuchung des Peptid H - Hydrolysates

IV Diskussion

1. Differenzierbarkeit der einzelnen Aminosäuren auf Grund der Färbung
2. Notwendigkeit der Anwendung von zwei verschiedenen Trennmethoden zur Isolierung einer Substanz
3. Diskussion der Ergebnisse

V Zusammenfassung

VI Literatur

I. Einleitung:

In seiner Dissertation beschreibt D o n h a u s e r ninhydrinpositive, hydrolysierbare Substanzen des Kalbsmyokard (1). Die vielfältigen Möglichkeiten zur Trennung und Isolierung ninhydrinpositiver Substanzen, die aus einem Gewebshomogenat gewonnen wurden, zeigen bereits die Schwierigkeit, derartige Gemische zu trennen und einzelne Stoffe daraus zu isolieren. Eine einzige Methode, wie z.B. die Chromatographie, die Elektrophorese oder die Gelfiltration, um nur einige zu nennen, erweist sich als ungenügend. Es ist notwendig eine geeignete Methoden - Kombination zu finden.

Als besonders effektiv kann die Kombination der Hochspannungselektrophorese mit der Gelfiltration und der Dünnschichtchromatographie angesehen werden. Die Hochspannungselektrophorese trennt niedermoleculare Stoffe je nach dem Ladungszustand, die Gelfiltration mit Sephadex, die einem Molekülsiebeffekt gleichkommt, trennt die Moleküle in Abhängigkeit von der Molekülgröße, die Dünnschichtchromatographie beruht bei der Trennung verschiedener Stoffe auf deren Löslichkeit in einem Lösungsmittelgemisch.

Die Aufgabe war nun, mit Hilfe dieser Methoden-Kombination eine niedermoleculare, ninhydrinpositive Substanz, im Folgenden Peptid H genannt, aus dem enteiweißten Extrakt des Kalbsmyokard zu trennen, zu isolieren und eine qualitative Analyse der Aminosäurenzusammensetzung dieser Substanz zu machen.

II. Methodik:

1.) Gewinnung des Materials

Das Herz eines gesunden Kalbes wurde sofort nach der Schlachtung aus dem Körper gelöst, indem das Pericard eröffnet und die Aorta möglichst distal vom Herzen durchtrennt wurde. Das Herz wurde in ein körperwarmes Tyrodebad gelegt und der Aortenstumpf mit einem Schlauchsystem verbunden. Durch dieses wurde ebenfalls Tyrodelösung von 37°C gespült, bis der Sinus coronarius makroskopisch frei von Blutbestandteilen war. Die anfangs bestehende Eigenaktion des Herzens konnte durch manuelle Massage längere Zeit erhalten werden. Nach Abtrennen der beiden Vorhöfe, der Gefäßreste und des epikardialen Fettgewebes und nach Eröffnung der beiden Ventricel, die nochmals ausgespült wurden, wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gesamte Prozedur dauerte nur einige Minuten.

Nach Auftauen beider Herzventrikel bis ungefähr 0 Grad Celsius wurden diese nochmals sauber von Fett und Gefäßresten freipräpariert und grob zerkleinert. Diese Gewebsstücke wurden im Verhältnis 1:2 mit Aqua bidest versetzt, jeweils zwei Minuten homogenisiert und bis zu 2o Stunden bei 0 Grad Celsius im Kühlschrank zur Extraktion aufbewahrt.

Nach Abpipettieren der aus Fett und Bindegewebe bestehenden Oberflächenschicht wurde das Homogenat im Gefrierpunktbereich bei einer Umdrehung von 34oor/Minute 2o Minuten zentrifugiert, der Überstand abgegossen und zu Weiterverarbeitung aufgehoben. Das Sediment wurde nochmals mit Aqua bidest vermischt und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Überstände wurden zusammenge-

schüttet, die Sedimente verworfen.

Um das gewonnene Material von höhermolecularen Proteinen zu trennen, wurde der gesamte Extrakt in der Ultrazentrifuge bei einer Umdrehungszahl von 28ooor/Minute zwei Stunden zentrifugiert. Auch hier verwarf man das Sediment.

Für die weitere Trennung der höhermolecularen Stoffe aus dem Extrakt erwies sich die Ultrafiltration als geeignet. Dafür wurde der Ultrafilter LKB 63oo A der Firma LKB - Produkter AB verwendet. Das Vakuum im Dialyseschlauch, der über ein Kunststoffgerippe gezogen wurde, konnte dadurch erreicht werden, daß dieser unten verknotet und oben mit einem Gummistopfen verschlossen wurde, durch den der Schlauch zur Wasserstrahlpumpe führte. Der Dialyseschlauch wurde in den Extrakt gestellt, der in einem Eiswasserbad stand.

Die Einengung des Gesamtextraktes, die durch häufigere Messungen des Eiweißgehaltes mit Hilfe der Biuretprobe im Eppendorf-Photometer erfolgte, wurde bei einem Eiweißgehalt von ungefähr 4,5% abgebrochen. Da durch den Dialyseschlauch nur Molecüle von einem MG unter 3oooo diffundieren konnten, handelte es sich bei dem neugewonnenen Material um ein Gemisch von niedermolecularen Stoffen.

Für die längerfristige Aufbewahrung wurde das Material lyophilisiert. Dies hatte den Vorteil, daß genaue Mengen abgewogen und gleichprozentige Lösungen hergestellt werden konnten. Das gefriergetrocknete Material wurde abgewogen in luft- und wasserdichte Reagenzgläser gegeben und

bei minus 15 - 2o Grad Celsius im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Aus einem Gramm Ausgangsmaterial konnten ungefähr 8 - 1o mg Trockensubstanz gewonnen werden.

2.) Trennungsmethoden und Apparaturen:

Zur Trennung, bzw. zur Analyse wurde eine Methoden-Kombination drei verschiedener Methoden angewandt.

a) Zur Trennung von Aminosäuren und Peptiden hat sich die Hochspannungselektrophorese (2,3) hervorragend bewährt. Verwendet wurde das Gerät der Firma Hölzel, Dorfen, das von Dozent Dr. W. Z i l l i g entwickelt wurde. Das Gerät erreicht in stufenloser Schaltung eine Spannung bis zu 1o KV und eine Stromstärke bis 2oomA. Das Wärmegefälle zwischen Träger, d.h. den puffergetränkten Papierstreifen, und dem Kühlmittel beträgt 2 - 3 Grad Celsius, so daß man bei Temperaturen arbeiten kann die ein Einfrieren des Streifens verhindern, obgleich die Temperatur im Streifen dicht oberhalb des Gefrierpunktes liegt (4). Die Trennkammer selbst besteht aus einer mit einer Folie überspannten Kupferplatte, die die Ausmaße von 1oo auf 45 cm hat. An beiden Enden stehen die Pufferwannen, die einerseits mit den Elektroden, andererseits über eine vierschichtige Filterpapierschicht mit dem Träger in Verbindung stehen. Bei der 1 m-Kammer werden Feldstärken bis zu 1oo Volt/cm erreicht.

b) Für die Identifizierung der Aminosäuren nach der Hydrolyse wurde neben der Hochspannungselektrophorese die Dünnschichtchromatographie angewandt (5,6,7,8). Zur Verwendung kamen die DV-Fertigplatten aus Kieselgel von der Firma Merck (2o mal 2o cm). Nach Auftragen der Substanzen wurden die Platten in eine rechteckige

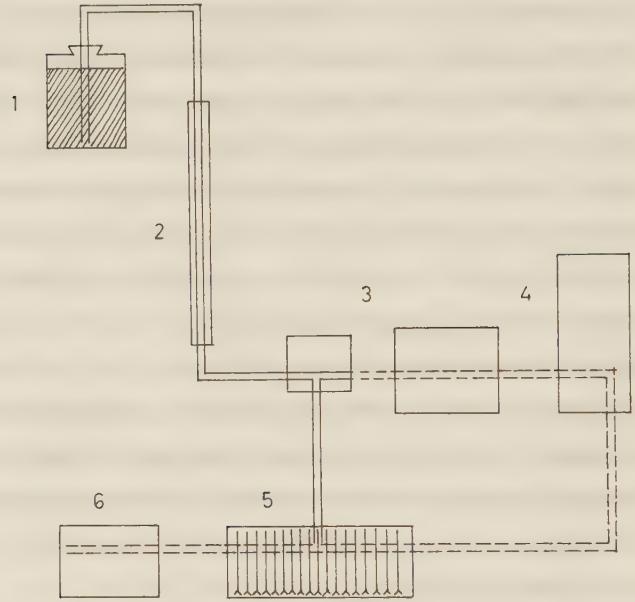
Trogkammer (Firma Desaga GmbH. Heidelberg), in die zuvor das Fließmittel gegeben wurde, gestellt. Die Höhe des Fließmittelspiegels in der Kammer betrug ungefähr fünf Millimeter. Um eine optimale Sättigung zu erreichen, wurde ein mit dem Fließmittel getränktes Filterpapier an der hinteren Wand der Kammer angelegt. Die Substanzen selbst wurden mit kleinen, über dem Bunsenbrenner ausgezogenen Kunststoffpipetten punktförmig im Abstand von 1,5 cm in der Horizontalen und 1 cm vom unteren Rand der Platte entfernt aufgetragen.

Wie A.R. F a h n y, A. N i e d e r w i e s e r, G. P a t a k i und M. B r e n n e r (9) angeben, ist für die Trennung von Aminosäuren mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie ein Gemisch von Phenol/Wasser gut geeignet. Dieses Gemisch wurde deshalb in einem Verhältnis 3:1 (geschmolzenes Phenol : Aqua bidest) angewandt.

c) Da es sich zeigte, daß für die Trennung von Aminosäuren-Peptid-Gemischen die Hochspannungselektrophorese alleine nicht ausreichte, wurde ein zweites Trennverfahren angeschlossen. J. P o r a t h wies 1960 auf die Trennmöglichkeit von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren mit Hilfe der Gelfiltration hin (10).

F l o d i n verwendete erstmals für die Gelfiltration ein Dextran (11). Ein modifiziertes Dextran bakteriellen Ursprungs stellt Sephadex dar. Dieses Dextran, das sich indifferent gegenüber Kationen und Anionen

verhält, besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk von Polysaccharidketten. Als Gel besitzt Sephadex Poren, deren Größe vom Grad der Vernetzung abhängt. Das bedeutet, daß mit Hilfe der Gelfiltration mit Sephadex eine Trennung von Molekülen in Abhängigkeit der Molekülgröße möglich ist. Die verschiedenen Sephadextypen weisen daher, entsprechend ihrem unterschiedlichen Vernetzungsgrad, verschiedene Trennbereiche auf. Da es sich bei der aus dem Aminosäuren-Peptidgemisch zu trennenden Verbindung um eine niedermoleculare, ninhydrinpositive Substanz handelte, wurde Sephadex G 1o verwendet, dessen Fraktionierungsbereich bis 7oo geht. Der Perldurchmesser beträgt 4o-12o, die Wasseraufnahme (ml/g trockenes Sephadex) 1,o $\pm$ o,1 und das Gelvolumen (ml/g) 2-3. Für die Gelfiltration wurde das Chromatographierohr LKB 49oo der Firma LKB-Produkter AB, Stockholm verwendet. (Siehe Bild 1).



1 Gefäß mit evakuiertem Aqua bidest.

2 Trennsäule: Typ K 9/60 der Firma Pharmacia fine chemicals (Upsala), Säulendurchmesser 9 mm, Säulenlänge 600 mm

3 UV-Absorptionsmessgerät (Uvicord I) LkB 4700, Überwachung bei einer Wellenlänge von 254 nm

4 Schreiber LKB 6520 H

5 Drehstand des Fraktionssammler mit

6 Steuergerät

3. Bereitung der Pherogramme

Als Träger in der Hochspannungselektrophorese wurde ein gewaschenes Papier der Firma Schleicher & Schüll (Nr.2o43 b Mgh) verwendet. Dies kam deshalb zur Anwendung, weil sich nach eigenen Untersuchungen gezeigt hatte, daß sich in ungewaschenem Papier Spuren von ninhydrin-positiven Substanzen befinden. H.H. S t r o h hat darauf hingewiesen, daß sich auch in ausgewaschenem Papier N - Substanzen befinden, die sich unter Umständen negativ auf den Analysegang auswirken können (14). Es wurden deshalb Papierstreifen des gewaschenen Papiers eluiert, das Eluat lyophilisiert und hochspannungselektrophoretisch getrennt.
Eine Färbung mit Ninhydrin verlief ergebnislos.
Die Breite des Papiers konnte je nach Bedarf variiert werden, während die Länge der Trennkammer-Länge entsprechen mußte. Um jede Verunreinigung zu vermeiden, wurde nur mit Einmal - Handschuhen gearbeitet.
Die zugeschnittenen Papierstreifen wurden zunächst in einer Pufferwanne mit dem Puffer getränkt, der auch bei der Elektrophorese verwendet wurde. Die Verweildauer in der Pufferwanne betrug lo - 15 Minuten. Danach wurden die Papierstreifen mit sauberem Filterpapier zweimal getrocknet. Nun wurde das zu trennende Material strichförmig auf das Papier mit den Plastikpipetten aufgetragen, wie sie auch bei der Dünnschichtchromatographie verwendet wurden. Die Auftragstelle wurde am Rand der Pherogramme mit einem Bleistift markiert. Um die gleiche Trennung bei verschiedenen Pherogrammen zu erreichen, wurde jeweils dieselbe Auftragstelle im Abstand von der Kathode, bzw. Anode gewählt. Bevor die Pherogramme in die Trennkammer gelegt

wurden, mußten diese mit einem Filterpapier abgetrocknet werden, da es durch die Temperaturunterschiede zur Bildung von Kondenswasser kam.

4. Verwendete Puffer in der Hochspannungselektrophorese:

Zwei Puffer waren für die Trennung des Aminosäuren-Peptid-Gemisches und der Aminosäurenstandards geeignet.

a. Acetatpuffer: pH = 3,6

Zusammensetzung: Pyridin:Eisessig:Aqua bidest.

1 : 10 : 89

Dieser Puffer liefert eine ausgezeichnete Trennschärfe. Er trennt die basischen, die sauren und die neutralen Aminosäuren gut voneinander. Während die neutralen Aminosäuren in einem Block laufen, werden die sauren, bzw. die basischen Aminosäuren untereinander teilweise getrennt.

b. Formiatpuffer: pH = 1,9

Zusammensetzung: Eisessig:Ameisensäure:Aqua bidest.

12 : 2,6 : 85,4

Dieser Puffer hat den Nachteil, daß es bei höher konzentriertem Material zu Schwanzbildung der einzelnen Bande kommt. Mit ihm konnten aber die neutralen Aminosäuren gut getrennt werden.

5. Färbemethoden:

Die nach dem Lauf luftgetrockneten Pherogramme, bzw. Kieselgelplatten wurden zunächst mit einer frisch angesetzten Ninhydrinlösung folgender Zusammensetzung gefärbt:

a. o,3%ige Ninhydrinlösung in Aceton, dem 1% Pyridin und 1% Eisessig zugesetzt werden.
Da diese Färbung den Nachteil hat sehr schnell ab= zublassen, wurde eine beständigere Färbelösung gewählt:

b. Cobalt-Chlorid (2%ig) und o,4%ige Ninhydrinlösung in Isopropanol. Die Abblassung der gefärbten Pherogramme und Kieselgelplatten konnte dadurch verhindert werden, daß sie im Tiefkühlschrank bei 18-2o Grad C aufbewahrt wurden, denn auch die Färbung mit Cobalt-Chlorid verliert im Laufe der Zeit seine Intensität.

6. Elutionsvorgang:

Von den nach dem Lauf luftgetrockneten Pherogrammen wurde an beiden Längsseiten jeweils ein Streifen von ungefähr 1,5 cm abgeschnitten. Beide Streifen wurden mit der dazugehörigen Seite des Pherogramms markiert. Danach erfolgt ihre Färbung mit der Ninhydrinlösung. Beide Streifen wurden nun wieder an das ungefärbte Pherogramm angeklebt. Der Bereich, der eluiert werden sollte, wurde mit einem Bleistift markiert und aus dem Pherogramm ausgeschnitten.

Die Elution erfolgte modifiziert nach der von C o n s d e n et al. angegebenen Methode (13). Eine flache Glaswanne wurde mit Aqua bidest bis zum Rand gefüllt. In das Aqua bidest wurde ein gedoppeltes Filterpapier in der Breite der Wanne gelegt. Dieses wurde nun über den Wannenrand gezogen, so daß die zu eluierenden Papierstreifen an ihm angebracht werden konnten. Durch die

wurden, mußten diese mit einem Filterpapier abgetrocknet werden, da es durch die Temperaturunterschiede zur Bildung von Kondenswasser kam.

4. Verwendete Puffer in der Hochspannungselektrophorese:

Zwei Puffer waren für die Trennung des Aminosäuren-Peptid-Gemisches und der Aminosäurenstandards geeignet.

a. Acetatpuffer: pH = 3,6

Zusammensetzung: Pyridin:Eisessig:Aqua bidest.

1 : 10 : 89

Dieser Puffer liefert eine ausgezeichnete Trennschärfe. Er trennt die basischen, die sauren und die neutralen Aminosäuren gut voneinander. Währendie neutralen Aminosäuren in einem Block laufen, werden die sauren, bzw. die basischen Aminosäuren untereinander teilweise getrennt.

b. Formiatpuffer: pH = 1,9

Zusammensetzung: Eisessig:Ameisensäure:Aqua bidest.

12 : 2,6 : 85,4

Dieser Puffer hat den Nachteil, daß es bei höher konzentriertem Material zu Schwanzbildung der einzelnen Bande kommt. Mit ihm konnten aber die neutralen Aminosäuren gut getrennt werden.

5. Färbemethoden:

Die nach dem Lauf luftgetrockneten Pherogramme, bzw. Kieselgelplatten wurden zunächst mit einer frisch angesetzten Ninhydrinlösung folgender Zusammensetzung gefärbt:

a. o,3%ige Ninhydrinlösung in Aceton, dem 1% Pyridin und 1% Eisessig zugesetzt werden.
Da diese Färbung den Nachteil hat sehr schnell ab= zublassen, wurde eine beständigere Färbelösung gewählt:

b. Cobalt-Chlorid (2%ig) und o,4%ige Ninhydrinlösung in Isopropanol. Die Abblassung der gefärbten Pherogramme und Kieselgelplatten konnte dadurch verhindert werden, daß sie im Tiefkühlschrank bei 18-2o Grad C aufbewahrt wurden, denn auch die Färbung mit Cobalt-Chlorid verliert im Laufe der Zeit seine Intensität.

6. Elutionsvorgang:

Von den nach dem Lauf luftgetrockneten Pherogrammen wurde an beiden Längsseiten jeweils ein Streifen von ungefähr 1,5 cm abgeschnitten. Beide Streifen wurden mit der dazugehörigen Seite des Pherogramms markiert. Danach erfolgt ihre Färbung mit der Ninhydrinlösung. Beide Streifen wurden nun wieder an das ungefärbte Pherogramm angeklebt. Der Bereich, der eluiert werden sollte, wurde mit einem Bleistift markiert und aus dem Pherogramm ausgeschnitten.

Die Elution erfolgte modifiziert nach der von C o n s d e n et al. angegebenen Methode (13). Eine flache Glaswanne wurde mit Aqua bidest bis zum Rand gefüllt. In das Aqua bidest wurde ein gedoppeltes Filterpapier in der Breite der Wanne gelegt. Dieses wurde nun über den Wannenrand gezogen, so daß die zu eluierenden Papierstreifen an ihm angebracht werden konnten. Durch die

Adhäsionskräfte wurden die Streifen, die unten spitz zugeschnitten wurden, gehalten. Es mußte darauf geachtet werden, daß ein gleichmäßiger Wasserdurchfluß gewährleistet war. Die Tropfgeschwindigkeit wurde auf einen Tropfen pro 10 Sekunden eingestellt. Die Streifen wurden solange eluiert, bis bei einer Testfärbung mit Ninhydrin keine Farbreaktion mehr auftrat. Danach zeigte sich, daß die Streifen nach 10-15 Minuten vollständig eluiert waren. Das Eluat wurde in einem Rundkolben aufgefangen, der nach Abschluß des Elutionsvorganges sofort an die Gefriertrocknungsmaschine angeschlossen werden konnte. Das lyophilisierte Material wurde im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

7. Hydrolyse:

Für die Analyse des eluierten Materials erwies sich die saure Hydrolyse als geeignet. 6n Salzsäure, zweimal destilliert, d.h. frei von störenden Metallionen, wurde im großen Überschuß in den Rundkolben mit dem lyophilisierten Material gegeben. Dadurch kann nach R. und A. C l o t t e n der Verlust an Aminosäuren reduziert werden. Der Rundkolben wurde an einen Rückfluß, der durch kaltes Leitungswasser gekühlt wurde, angeschlossen. Um eine gleichmäßige Temperatur zu erreichen, wurde der Rundkolben in ein durch einen Thermostat geregeltes Palmin-Ölbad gestellt, dessen Temperatur plus 165 Grad C betrug. Das Material wurde 48 Stunden hydrolisiert. Nach der Hydrolyse mußte die Salzsäure wieder aus dem Hydrolysat entfernt werden. Dies wurde erreicht, indem der offene Rundkolben in einen evacuierten Exsiccator,

dessen Boden mit fester NaOH bedeckt war, gestellt wurde. Nach ungefähr 24 Stunden war die Salzsäure vollständig entfernt.

Der Nachteil der sauren Hydrolyse besteht darin, wie R. und A. C l o t t e n, bzw. M.W. R e e s (1946) nach eigenen Untersuchungen angeben, daß einige Aminosäuren zerstört oder oxydiert werden. So werden Serin und Threonin bis zu 10% zerstört, Tryptophan wird völlig zerstört, Glutamin und Asparagin werden zu Glutaminsäure, bzw. Asparaginsäure oxydiert, Cystin und Cystein werden ebenfalls teilweise zerstört oder zu Cysteinsäure oxydiert.

III. Ergebnis:

1. Charakter der untersuchten Verbindung:

Die typische Anfärbbarkeit eines Stoffes mit Ninhydrin zeigt, daß er alphaständige NH_2-oder NH-Gruppen besitzt, daß er außerdem ein niederes Moleculargewicht hat, da zum Beispiel höhermoleculare Peptide ninhydrin-negativ reagieren.

D o n h a u s e r hydrolysierte den enteiweißten Vollextrakt des Kalbsmyokardes und sah, daß mehrere Bande, die hochspannungselektrophoretisch vor der Hydrolyse nachweisbar waren, sich danach bei der Färbung mit Ninhydrin nicht mehr darstellten. Die untersuchte Substanz, die aus diesem Spektrum der hydrolisierbaren Verbindungen herausgegriffen wurde, mußte deshalb Peptidcharakter haben, da sie ninhydrinpositiv und Hydrolysierbar war.

2. Lage von Peptid H im Gesamtextrakt nach der hochspannungselektrophoretischen Trennung (Bild 2):

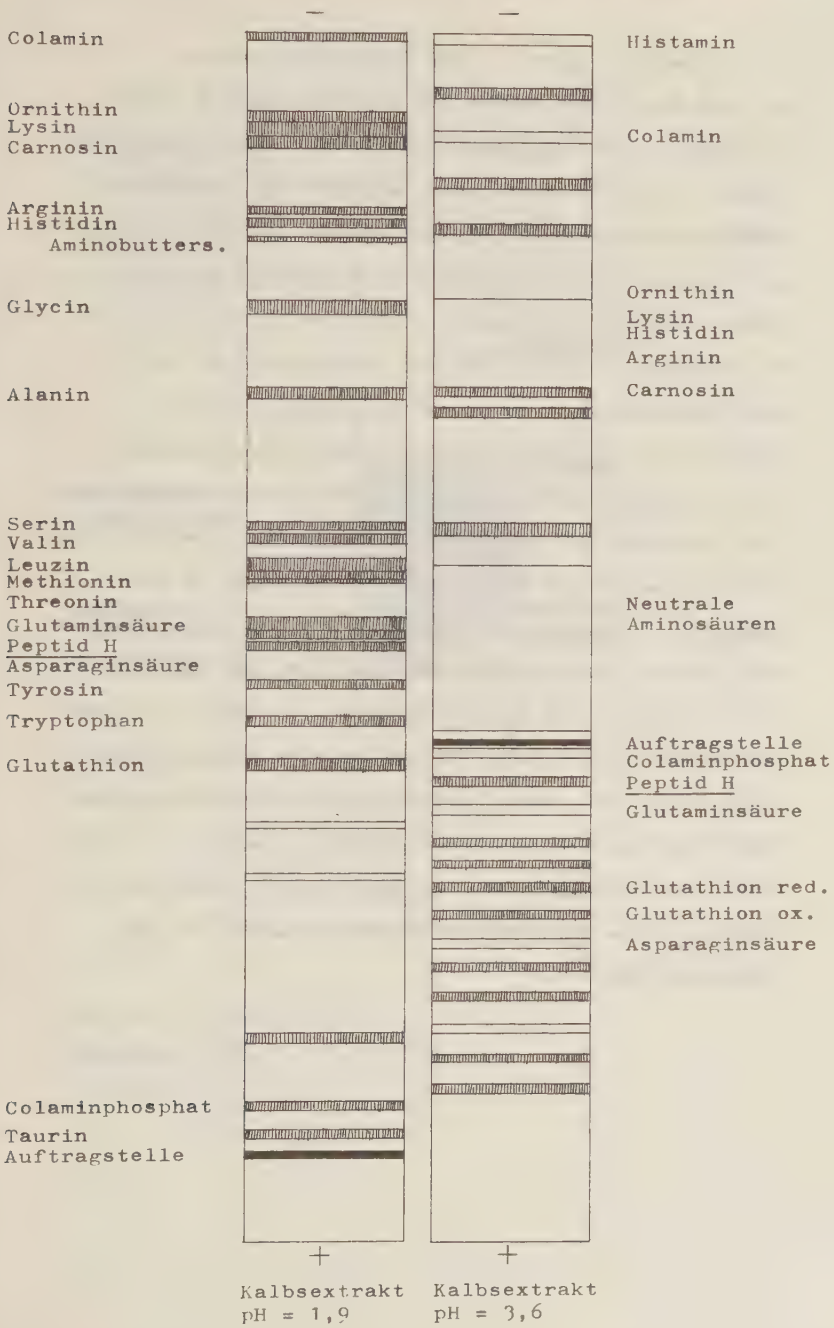
Bei den Versuchen wurde 5%iger Kalbsextrakt aufgetragen.

a. Peptid H liegt bei dem Puffer von pH=1,9 kathodenwärts von der Auftragstelle im Bereich der Glutaminsäure und Asparaginsäure.

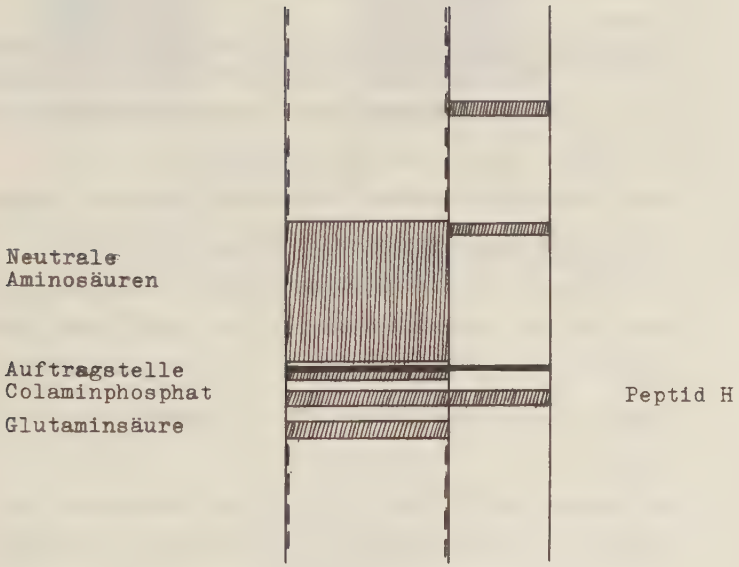
b. Bei einem Puffer von pH=3,6 liegt Peptid H anodenwärts von der Auftragstelle zwischen Colaminphosphat und Glutaminsäure. Bei diesem Puffer ist das Band gut von den Nachbarbanden isoliert.

Aus der Wanderung im elektrischen Feld kann gesagt werden, daß dieses Peptid sauer reagiert.

Lokalisation von Peptid H im Gesamtkalbsextrakt bei den Puffern pH = 1,9 bzw. pH = 3,6



3. Isolierung des Peptid H aus dem Gesamtextrakt:
Da sich bei einem Puffer von pH=3,6 Peptid H scharf isoliert von den übrigen Banden darstellte, wurden bei diesem Puffer 2o Pherogramme angefertigt. Dazu wurde 1o%iger Kalbsextrakt, in Aqua bidest gelöst, aufgetragen. Die Auftragstelle wurde in der Mitte der Pherogramme gewählt, die Laufzeit auf drei Stunden erhöht. Die Spannung betrug 5 kV, die Stromstärke 6o mA.
Die Pherogramme wurden nicht wie üblich im Trockenschrank bei 12o Grad C, sondern bei Zimmertemperatur im Abzug getrocknet. Frühere Untersuchungen hatten nämlich gezeigt, daß durch den Trockenvorgang bereits Substanzveränderungen eintraten. Der Bereich, in dem Peptid H lag, wurde aus den Pherogrammen ausgeschnitten und eluiert. Das Eluat wurde mit Hilfe der Gefriertrocknung eingeengt und bei einem Puffer von pH=3,6 zusammen mit 5%igem Kalbsextrakt in der Hochspannungselektrophorese geprüft. Dabei zeigte sich beim Eluat ein auf Höhe von Peptid H (im Gesamtextrakt) liegendes starkes Band, ein schwaches Band im Bereich der neutralen AS und ein etwas stärkeres Band kathodenwärts der neutralen AS (Bild3).



Laufzeit: 2 Std. 30 Min.
Spannung: 5 kV
Stromstärke: 60 mA

4. Reindarstellung von Peptid H:

Da sich nach der Eluation von Peptid H aus den Pherogrammen bei einem Puffer von pH=3,6 gezeigt hatte, daß dieses nicht rein war, wurde als zweites Trennverfahren die Gelfiltration durchgeführt.

a. Vorlauf in der Säule:

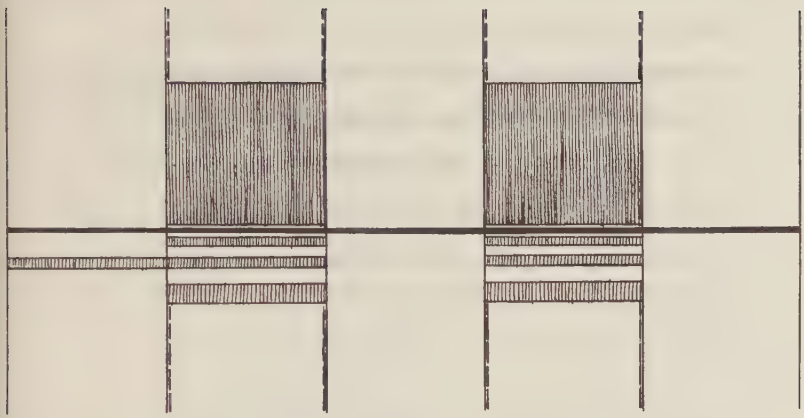
Um Verunreinigungen in der Säule auszuschließen, wurde diese vor den eigentlichen Versuchen mit evakuiertem Aqua bidest sechs Stunden ausgewaschen.

Danach wurde das gesamte, durch die Eluierung gewonnene und gefriergetrocknete Material mit o,5 ml Aqua bidest versetzt. In einem Vorlauf wurde nun geprüft, ob es prinzipiell möglich war, die Bande, die sich bei dem Puffer von pH=3,6 in der Hochspannungselektrophorese gezeigt hatten, von Peptid H zu trennen.

Dazu wurden o,15 ml des Material mit Saccharose versetzt in die Säule gebracht. Die Zeitdauer pro Fraktion betrug 6 Min. 4o Sek., das gewonnene Material pro Fraktion ergab o,85-o,9o ml. Insgesamt wurden 32 Fraktionen gewonnen. Bei den Fraktionen 13-2o zeigt sich die in Abbildung (4) dargestellte doppelgipfelige Kurve.

Zur hochspannungselektrophoretischen Analyse wurden folgende Fraktionen zusammengegeben: Fraktion 13,14, Fraktion 15,16,17 und Fraktion 18,19. Nach erneuter Lyophilisierung der Fraktionsgruppen erfolgte die Prüfung in der Hochspannungselektrophorese. Es zeigte sich nach der Färbung mit Ninhydrin ein starkes Band von Peptid H in der Fraktionsgruppe 15,16,17. (Abbildung 5).

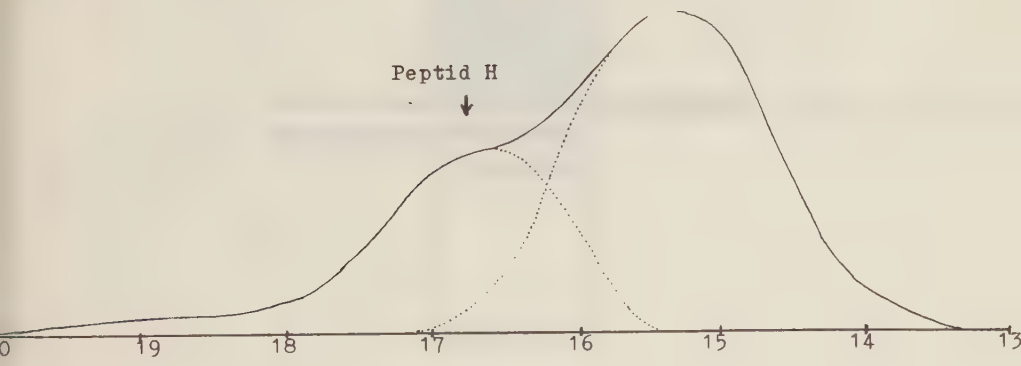
Bild 5



Fraktion: 15,16,17 | Kalbsextrakt | Fraktion: 18,19 | Kalbsextrakt | Fraktion: 13,14

Vorlauf:

Bild 4

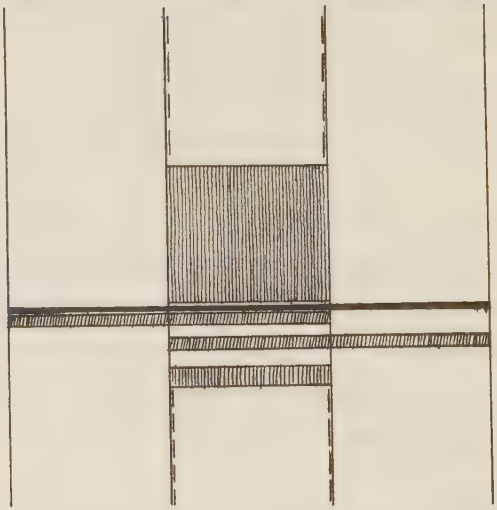


b. Aus zweierlei Gründen wurde nochmals ein Pherogramm angefertigt (Bild 6).

1. Abgrenzung des Peptid H (im Vergleich zum Gesamtextrakt) von Colaminphosphat und Glutaminsäure.
2. Reinheitsprüfung von Peptid H nach der Gelfiltratio

Peptid H stellte sich bei einem Puffer von pH=3,6 hochspannungselektrophoretisch nach der Gelfiltration rein dar.

Bild 6



Puffer: pH = 3,6
Laufzeit: 2 Std. 30 Min.
Spannung: 5 kV
Stromstärke: 60 mA

c. Hauptlauf in der Säule:

Das gesamte Material von o,35 ml wiederum mit Saccharose versetzt wurde in die Säule gebracht.' Insgesamt ergaben sich 44 Fraktionen. An Material pro Fraktion wurden o,85 - o,9o ml gewonnen; die Zeitdauer pro Fraktion betrug 6 Min. 4o Sek. Hier zeigte sich das in Abbildung (7) dargestellte Kurvenbild im Bereich der Fraktionen 12-2o. Für die Prüfung in der Hochspannungselektrophorese wurden folgende Fraktionen zusammengegeben: 12,13, 14/ 15,16/ 17,18,19.

Nach Lyophilisierung der Fraktionsgruppen erfolgte die Prüfung in der Hochspannungselektrophorese bei einem Puffer von pH=3,6 (Abbildung 8).

Dabei zeigte sich in der Fraktionsgruppe 12,13,14 kein Band, in der Fraktionsgruppe 15,16 ein schwaches Band und in der Fraktionsgruppe 17,18,19 ein starkes Band von Peptid H. Auch hier stellte sich Peptid H rein dar.

Hauptlauf:

Bild 7

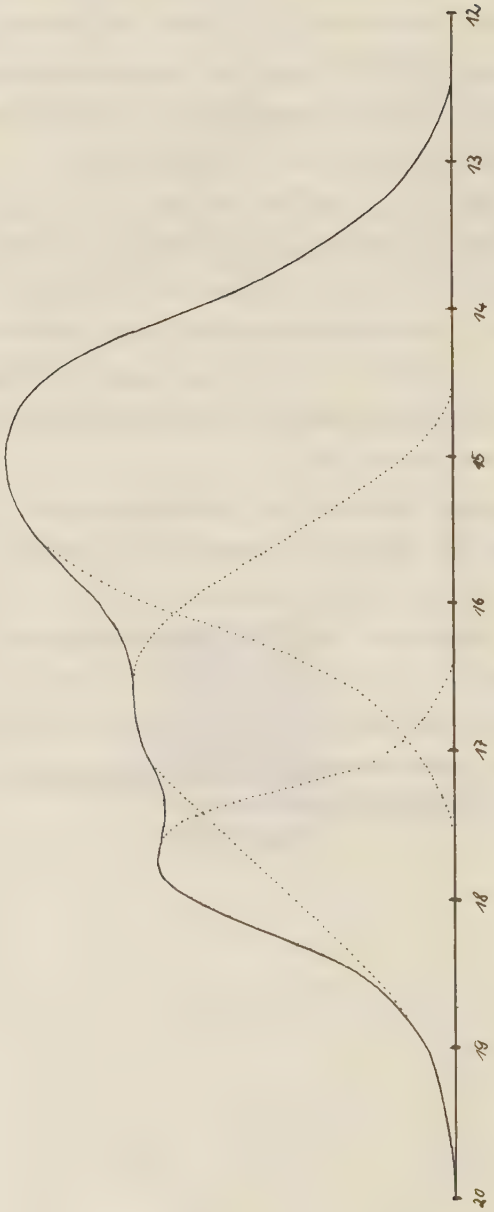
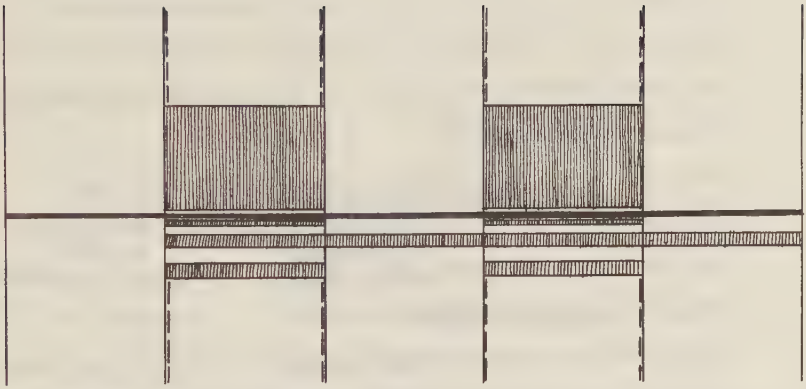


Bild 8

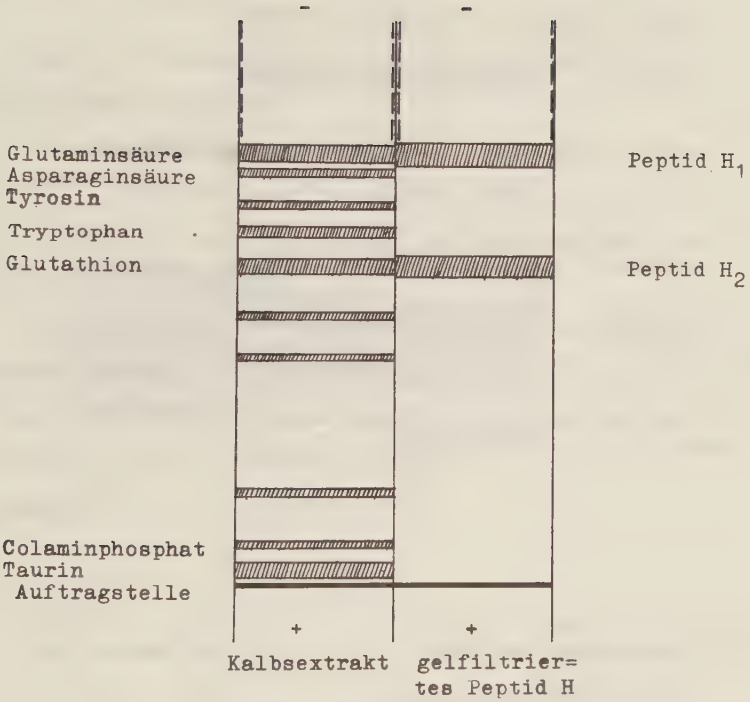


Fraktionen: 12,13,14 | Kalbsextrakt | Fraktionen: 15,16 | Kalbsextrakt | Fraktionen: 17,18,19

Puffer: pH = 3,6
Laufzeit: 2 Std. 30 Min.
Spannung: 5 kV
Stromstärke: 60 mA

d. Darstellung und Reinigung von Peptid H in der Hochspannungselektrophorese bei einem Puffer von pH=1,9:
Nachdem die Fraktionsgruppe 15,16,17 des Vorlaufes und die Fraktionsgruppen 15,16, bzw. 17,18,19 des Hauptlaufes, in denen sich Peptid H bei dem Puffer von pH=3,6 rein dargestellt hatte, zusammengegeben worden waren, erfolgte die weitere Prüfung von Peptid H bei einem Puffer von pH=1,9 in der Hochspannungselektrophorese (Abbildung 9).
Es stellten sich zwei Bande dar: Ein starkes Band auf der Höhe von Glutaminsäure (Peptid H_1 bezeichnet) und ein sehr schwaches Band auf der Höhe von Glutathion (Peptid H_2 bezeichnet).
Beide Bande wurden nochmals getrennt eluiert und nach der Gefriertrocknung im Überschuß mit 6n Salzsäure versetzt. Darauf erfolgte die Hydrolyse beider Eluate. Da die Prüfung des Peptid H_2- Hydrolysates in der Hochspannungselektrophorese keinen Nachweis einer ninhydrinpositiven Substanz ergab, wurde es für den weiteren Analysegang nicht mehr berücksichtigt.

Bild 9


Glutaminsäure
Asparaginsäure
Tyrosin
Tryptophan
Glutathion
Peptid H_1
Peptid H_2
Colaminphosphat
Taurin
Auftragstelle
Kalbsextrakt
gelfiltrier=
tes Peptid H

5. Analyse des Peptid-H_1 (=H)-Hydrolysates:

Zur Identifizierung der Aminosäurenzusammensetzung des Hydrolysates wurden zwei Aminosäurenstandards (I und II) angesezt, die jeweils mit dem Hydrolysat auf den Pherogrammen aufgetragen wurden.

a. Überprüfung des Hydrolysates bei einem Puffer von pH=1,9 (Bild 1o).

Danach zeigten sich folgende Bande:

ein Band auf Höhe von Histidin (Standard I), bzw. Arginin (Standard II),

ein Band auf Höhe von Glycin (Standard II),

ein Band auf Höhe von Serin (Standard II),

ein Band auf Höhe von Leucin (Standard I), bzw. Threonin (Standard II),

ein Band auf Höhe von Glutamin (Standard I), bzw. Glutaminsäure und Asparagin (Stand.II)

ein Band auf Höhe von Asparaginsäure, Phenylalanin, Cystin (Standard I),bzw. Cystein (Standard II).

b. Überprüfung des Hydrolysates bei einem Puffer von pH=3,6 (Bild 11).

Hier erschienen folgende Bande:

ein Band auf der Höhe von Arginin (Standard II),

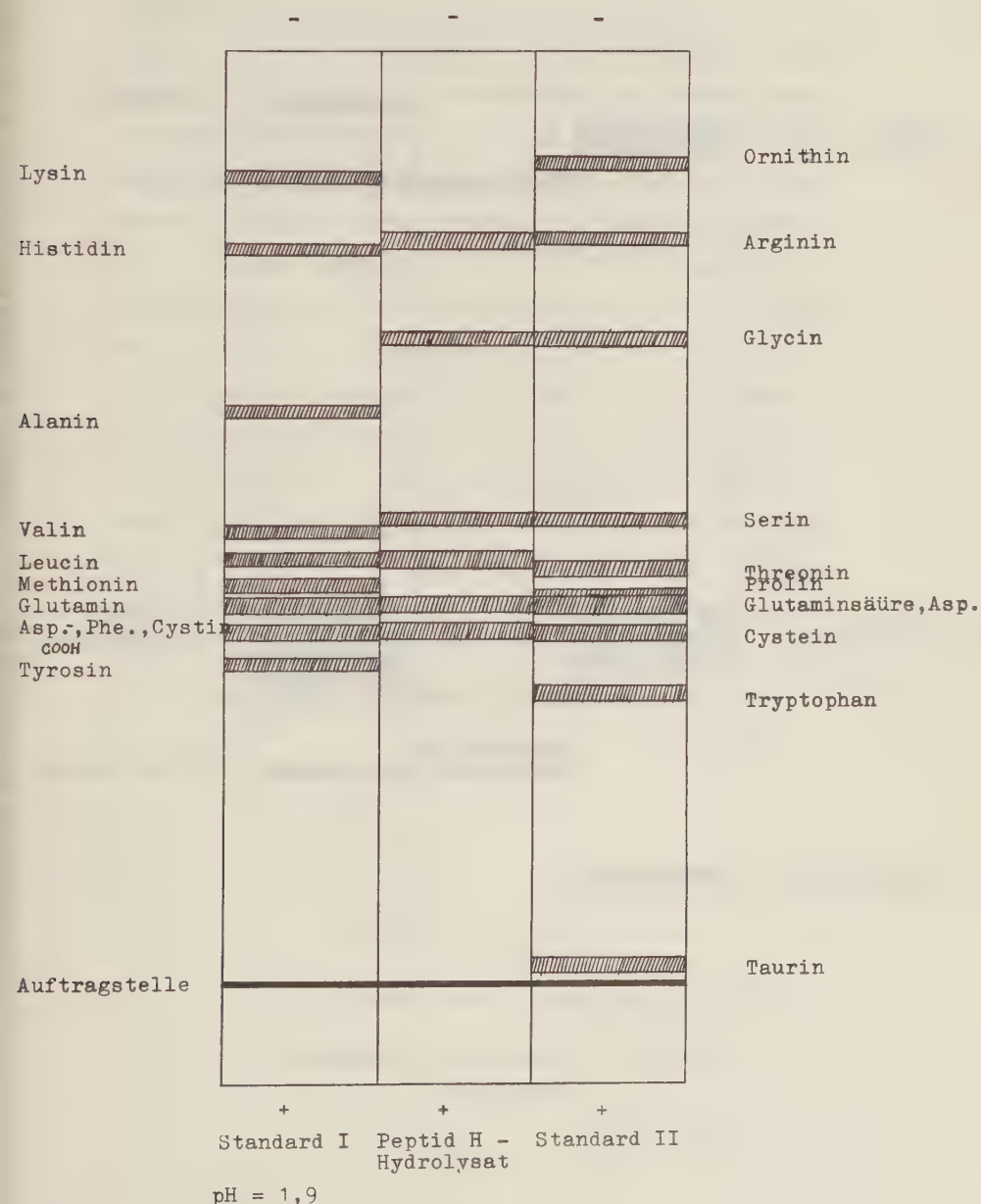
zwei Bande im Bereich der neutralen Aminosäuren,

ein Band zwischen der Auftragstelle und Glutaminsäure (Standard II),

ein Band auf Höhe von Glutaminsäure (Standard II).

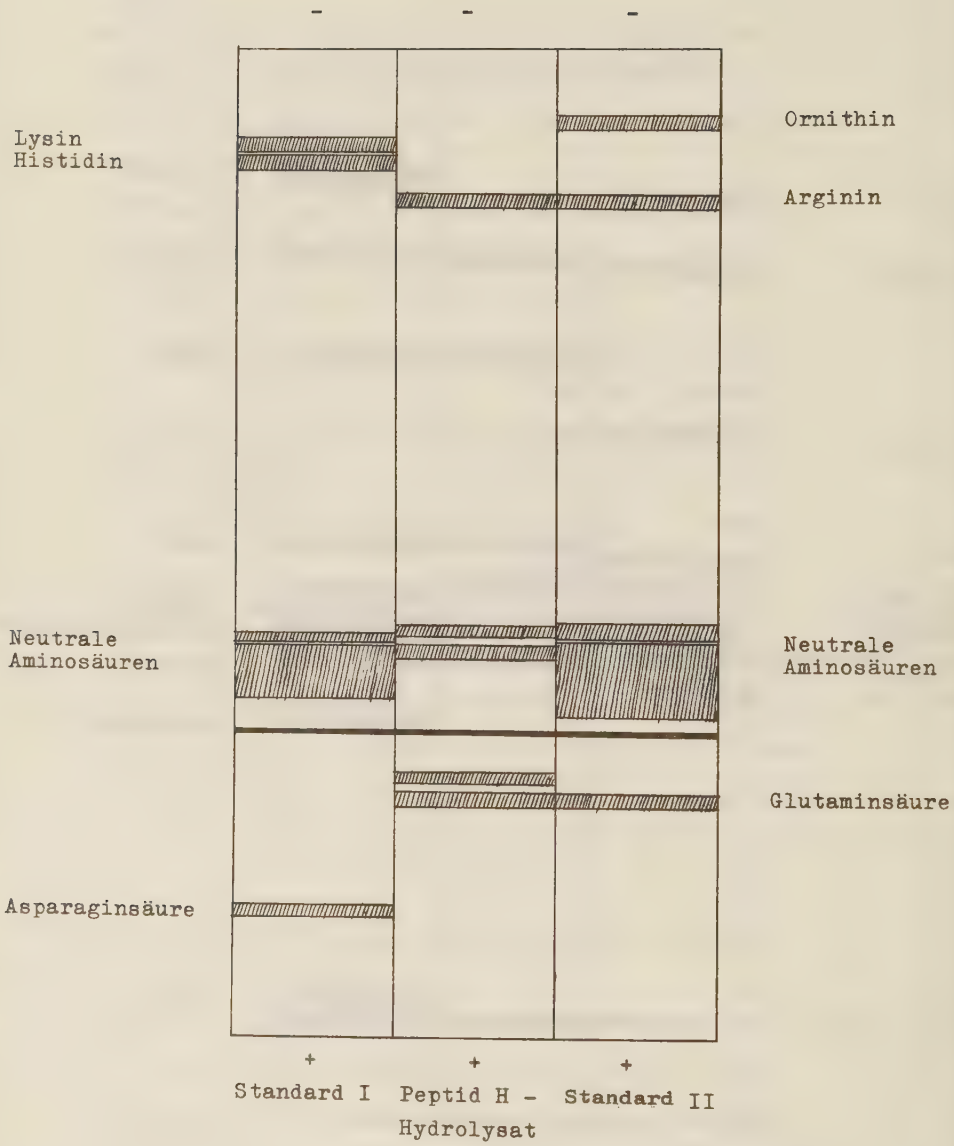
Analyse des Peptid H -Hydrolysates:

Bild 10



pH = 1,9

Bild 11


- - -
Lysin
Histidin
Ornithin
Arginin
Neutrale
Aminosäuren
Neutrale
Aminosäuren
Glutaminsäure
Asparaginsäure
+ + +
Standard I
Peptid H - Hydrolysat
Standard II

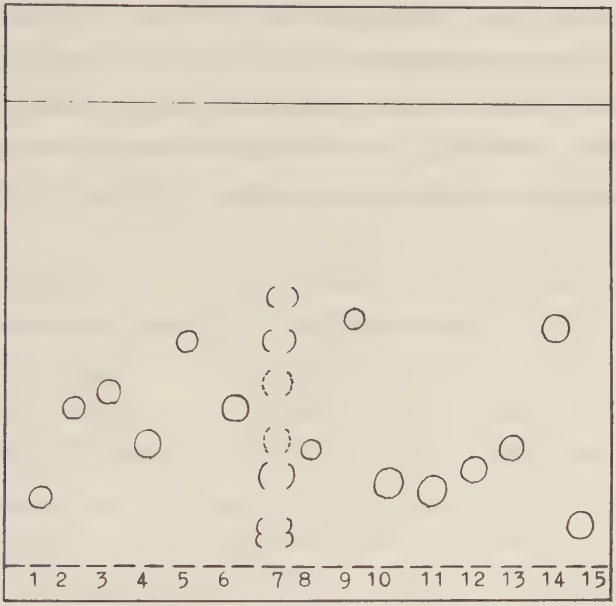
pH = 3,6

Nach der Analyse mit den Puffern von pH=1,9 bzw. 3,6 konnten folgende Aminosäuren sicher identifiziert werden: Glycin, Serin, Arginin, Glutaminsäure und Phenylalanin. Bei einem Puffer von pH=1,9 laufen Glutamin, Glutaminsäure und Asparagin auf gleicher Höhe. Da Glutamin und Asparagin bei der sauren Hydrolyse zu Glutamin-, bzw. Asparaginsäure oxydiert werden, konnte das Band nur Glutaminsäure sein. Dies bestätigte sich bei der Prüfung bei einem Puffer von pH=3,6.

Die Aminosäuren Asparaginsäure, Phenylalanin, Cystin und Cystein laufen ebenfalls bei einem Puffer von pH=1,9 auf gleicher Höhe. Cystin bzw. Cystein werden bei der sauren Hydrolyse zu Cysteinsäure oxydiert. Diese konnte nicht nachgewiesen werden. Asparaginsäure erschien bei einem Puffer von pH=3,6 nicht. Das Band, das sich bei einem Puffer von pH=1,9 darstellte, mußte mit größter Wahrscheinlichkeit Phenylalanin sein.

c. Analyse mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Bild 12):
Da es nicht möglich war eine Aussage zu machen, um welche Aminosäure es sich handelte, die sich bei einem Puffer von pH=1,9 auf der Höhe von Leucin (Standard I), bzw. Threonin (Standard II) darstellte, wurde das Hydroysat dünnschichtchromatographisch getrennt. Als Laufmittel wurde Phenol-Wasser verwendet. Die Laufzeit betrug 9 Stunden.
Hinderlich wirkte sich bei diesem Lauf die Schwanzbildung im Bereich des Hydrolysates aus.
Es zeigte sich auf der Höhe von Leucin ein Punkt.
Ein weiterer Punkt lag über Prolin. Nach früheren Versuchen läuft bei diesem Fließmittel Phenylalanin vor Prolin am weitesten von allen Aminosäuren. Die Bestimmung des Rf-Wertes ließ Phenylalanin vermuten. Ein Trennpunkt auf der Höhe von Threonin konnte nicht nachgewiesen werden.

Bild 12



1 Histidin	8 Asparagin
2 Cystein	9 Prolin
3 Valin	10 Glutaminsäure
4 Alanin	11 Serin
5 Leucin	12 Glycin
6 Glutamin	13 Threonin
7 Peptid H = Hydrolysat	14 Methionin
	15 Arginin

d. Endergebnis der Untersuchung des Peptid-H-Hydrolysates: Mit Hilfe der Standards I und II konnten durch die Puffer von pH=1,9 bzw. 3,6 Arginin, Glycin, Serin, Glutaminsäure und Phenylalanin sicher identifiziert werden. Letzteres bestätigte sich auch mit der Dünnschichtchromatographie. Diese erlaubte auch die Identifizierung von Leucin. Das Band, das sich bei einem Puffer von pH=3,6 zwischen Glutaminsäure und der Auftragstelle zeigte, konnte nicht aufgeklärt werden.

IV. Diskussion

1. Differenzierbarkeit der einzelnen Aminosäuren auf Grund der Färbung.

   Die Aufklärung einzelner Aminosäuren in einem Hydrolysat, bzw. in einem Aminosäuren/Peptidgemisch, erfolgte mit Hilfe von Aminosäurenstandards und nachfolgendem Färben mit Ninhydrin. Die Färbung diente letztlich nur zur Lagefeststellung. H. S t ü b c h e n - K i r c h n e r (16) färbte die Chromatogramme mit kollidinhaltigem Ninhydrin-Reagenz und besprühte sie nachfolgend mit äthanolischer KOH. Durch die Farbe des gebildeten Farbstoffes bei Tageslicht, durch die Farbe der Fluoreszenz, die Zeitdauer und Bedingungen bis zum Auftreten der Fluoreszenz, sowie eventuelle Übergangsfärbungen werden bereits einzelne Aminosäuren deutlich voneinander unterschieden. Die Möglichkeit dieser Differenzierbarkeit ist aber nur gegeben, wenn genügende Mengen von anfärbbaren Substanzen in dem zu untersuchenden Pherogrammen vorhanden sind. Die Aminosäuren des Hydrolysates konnten zwar mit der Ninhydrinfärbung lokalisiert werden, eine Farbunterscheidung der einzelnen Bande ließ sie aber nicht zu.

2. Notwendigkeit der Anwendung von zwei verschiedenen Trennmethoden zur Isolierung einer Substanz.

   Bei den Pherogrammen, die bei einem Puffer von pH=3,6 angefertigt wurden, erscheint Peptid H als deutlich abgesetztes, einheitliches Band. Dennoch zeigte die Überprüfung des Eluates unter gleichen Bedingungen Verunreinigungen durch ninhydrinpositive

Substanzen, die elektrophoretisch normalerweise in anderen Bereichen laufen. G r a n z e r (17) sowie G r a s s m a n n (18) beobachteten das gleiche Phänomen. Anscheinend enthalten die elektrophoretisch getrennten Bande geringe Mengen von Aminosäuren und Peptiden. G r a n z e r führt dies auf Nebenvalenzbindungen zurück. Um dieses Problem zu umgehen, schlug G r a n z e r den Zusatz von dissoziierenden Mittel zur Pufferlösung vor. Eine weitere Möglichkeit wäre, die Substanz bei einem anderen Puffer elektrophoretisch zu trennen und nochmals zu eluieren. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, kann auch eine völlig andersartige Trennmethode eingeführt werden, nämlich die Gelfiltration. Nach J. P o r a t h (1o) ist die Wanderungsgeschwindigkeit hier unabhängig von pH und Puffer. Das Material bedarf keiner Zusätze, die sich bei der späteren Analyse störend auswirken und es tritt kein Materialverlust ein. Ähnlich wie bei der Hochspannungselektrophorese bei höheren Konzentrationen verschlechert sich die Trennung bei der Gelfiltration mit je mehr Material die Säule beladen wird.

Beide Methoden, die Hochspannungselektrophorese und die Gelfiltration, ergänzen sich in der Trennung von Aminosäuren und Peptiden. Beide liefern bei gleichen Bedingungen reproduzierbare Ergebnisse, wobei die Trennschärfe und die Reproduzierbarkeit der einzelnen Fraktionen bei der Gelfiltration nach V. S t e p a n o v (12) nicht so sehr von der Durchlaufgeschwindigkeit als vielmehr vom Vernetzungsgrad des verwandten Dextran abhängen.

Der Nachteil dieser Methodenkombination liegt darin, daß nur sehr geringe Mengen von Material gewonnen werden können. Eine quantitative Anreicherung ist nur in begrenztem Rahmen möglich.

Im Laufe der experimentellen Arbeit stellte sich die Frage, welche der beiden Methoden an den Anfang gestellt werden soll. Nach den Arbeiten von D o n h a u s e r (1) und K o t h n y (19) bringt eine Vorfraktionierung des Gesamtextraktes bessere Trennungen in der Hochspannungselektrophorese. Sie verwendeten dazu die trägerfreie, präparative Elektrophorese, eine Methode, die einen erheblichen apparativen Aufwand erfordert. Da die Einzelfraktionen dennoch das gesamte Aminosäuren/Peptidspektrum zeigten, wurde dieser Schritt durch Anwendung höherer Konzentrationnen in der Hochspannungselektrophorese ausgeglichen, vor allem deshalb, weil sich Peptid H isoliert darstellte. Auch die Vorfraktionierung des Gesamtextraktes mit Hilfe der Gelfiltration trennt das Material in weniger deutliche Fraktionen wie A l t a n e r (2o) anhand von Leberextrakten zeigte. Alle Fraktionen ließen sich elektrophoretisch in weitere ninhydrinpositive Fraktionen auftrennen. Aus diesen Gründen wurde die Trennung des Gesamtextraktes in der Hochspannungselektrophorese an den Anfang gestellt, zumal die folgende Gelfiltration bessere Trennungsergebnisse erwarten ließ.

3. Diskussion der Ergebnisse:

Peptid H hatte sich nach Eluierung aus den Pherogrammen (pH=3,6) und der Gelfiltration bei nochmaliger Prüfung in der Hochspannungselektrophorese bei dem gleichen Puffer als ein einheitliches Band ohne Verunreinigung gezeigt.

Die elektrophoretische Prüfung bei einem Puffer von pH=1,9 ergab dennoch eine Verunreinigung durch eine ninhydrinpositive Substanz. Eine parielle Hydrolyse läßt sich mit größter Wahrscheinlichkeit ausschließen, da es sich bei dem Peptid H um eine stabile Verbindung handeln muß, wie die Ergebnisse der Hydrolyse zeigen. Es könnte sich bei dieser Verunreinigung um eine Substanz handeln, die mit Peptid H bei einem Puffer von pH=3,6 in der Hochspannungselektrophorese überlagernd läuft und auch durch die Gelfiltration von ihm nicht getrennt werden kann. Eine Schwierigkeit für die Identifizierung der Aminosäurenzusammensetzung des Hydrolysates bedeutet das Band, das bei der Prüfung mit dem Puffer von pH=1,9 aufgetreten war. In diesem Bereich, also zwischen Glutaminsäure und der Auftragstelle, liegt keine Eiweiß-Aminosäure. Es kann vermutet werden, daß es sich hierbei um Spuren von nichthydrolysiertem Peptid H handelt, da dieses in diesem Bereich läuft. C l o t t e n gibt an, daß die Hydrolysedauer von stabilen Peptiden auf über 72 Stunden gesteigert werden muß. Eine erneute Hydrolyse konnte aber wegen der geringen Materialmenge nicht mehr durchgeführt werden.

V. Zusammenfassung:

Aus dem enteiweißten Extrakt des Kalbsmyocard konnte eine ninhydrinpositive Substanz mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese und der Gelfiltration isoliert werden. Die Reinheitsüberprüfung erfolgte in der Hochspannungselektrophorese bei Puffern mit verschiedenen pH. Die Identifizierung der Aminosäurenzusammensetzung des Hydrolysates der ninhydrinpositiven Substanz geschah mit der Hochspannungselektrophorese und der Dünnschichtchromatographie. Soweit es die Methodik erlaubte, konnten die Aminosäuren Arginin, Glycin, Serin, Glutaminsäure, Leucin und Phenylalanin aufgeklärt werden.

VI Literatur:

1. Donhauser Dissertation1968 München:
Über hydrolysierbare ninhydrinpositive Bestandteile des Myokard.

2. Clotten R. und A.
Hochspannungselektrophorese;Thiemeverlag 1962

3. I. Antener, Bruchi H., Kaiser M.
Hochspannungselektrophorese der Aminosäuren und ihre Anwendung in der klin. Chemie.
Bulletin 11 Vol. 6 (1965) Schweizer Vereinigung für klinische Chemie.

4. Hochspannungselektrophorese-Apparatur (Anleitung)
Firma Hölzel, Dorfen.

5. Randerath Kurt:
Dünnschichtchromatographie;Verlag Chemie 1962

6. Stahl Egon:
Dünnschichtchromatographie;Springerverlag 1967

7. Pataki G.
Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie(1966)
Verlag Walter de Gruyter, Berlin.

8. H. Determann, Th. Wieland und G. Lüben:
Neue Anwendung der Dünnschichtchromatographie, Experientia (Basel) 18/43o 1962.

9. A.R. Fahny, A. Niederwieser, G. Pataki und M. Brenner
Dünnschicht-Chromatographie von Aminosäuren auf Kieselgel GII. Eine Schnellmethode zur Trennung und zum qualitativen Nachweis von 22 Aminosäuren. Helv.chim.Acta 44/2o22 1961

1o. Porath J.
Gel filtration of proteins, peptides and amino acids
Biochimica et Biophysica Acta 39/4o 196o

11. Flodin P.
Dextran gels and their applications in gel filtration
(Uppsala 1962)

12. V. Stepanow, D. Handschuh und F.A. Anderer
Peptidtrennung mit Sephadex, Zeitschrift für Naturforschung (B) 16 B:626-7, Sept. 1961

13. Consden R., A.J.P, Martin, A.H. Gordon, R.L.M. Synge
Ionophoresis in silica jelly, A method for the separation of amino acids and peptides.
Biochem. J. 4o (1946) 33

14. H.H. Stroh
Untersuchung über den Gehalt an nicht auswaschbaren N-Substanzen in Papiersorten für die Papierchromatographie. Pharmazie 11 (1956) 473

15. Atfield G.N. Morris C.J.O.
Analytical separation by High-Voltage Paper Electrophoresis, Amino acids in Protein Hydrolysates.
The Biochemical Journal 81, 6o6-614 (1961)

16. Stübchen-Kirchner Harald
Eine Verbesserung der Differenzierbarkeit von Aminosäuren mit Ninhydrin.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift Physiolog.Chemie 1968, 349:1o49

17. Granzer E. (1958)
Eine Methode zur Verbesserung der elektrophoretischen Trennung von Proteinen und Peptiden.
Hoppe - Seyler's Zeitschrift Physiolog. Chemie 311, 46-37o

18. Grassmann W. Strobel R., Hannig K., Deffner-Plöckl M., (1956)
Zur Konstitution des Insulins.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift Physiolog. Chemie 3o5, 21-3o7

19. Kothny K., (1968)
Hochspannungselektrophoretische Untersuchungen der freien Aminosäuren des Kalbsherzens.
Dissertation, München

2o. Altaner C., (1962)
Fractionation of the Liver Extract on Sephadex G 25
Experientia 18, 568-569

Herrn Professor Dr.H. Nowy danke ich aufrichtig für die Überlassung des Themas, seine Hilfe und Ratschläge bei der Durchführung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch dem Leiter der Medizinischen Poliklinik der Universität München, Herrn Professor Dr.W. Seitz, an dessen Klinik ich den experimentellen Teil der Arbeit durchführen konnte.

Einen besonderen Dank möchte ich meinen Mitarbeitern aussprechen.

L e b e n s l a u f

Am 7. Januar 1942 wurde ich als Sohn des Forstmeisters Benedikt Enzler und seiner Ehefrau Ottilie Enzler, geb. Schilke, in Nittenau, Oberpfalz, geboren.
Meine frühe Kindheit verbrachte ich in Bodenwöhr.
Nach Versetzung meines Vaters nach Schönberg im Bayer. Wald besuchte ich dort die Volksschule bis zur fünften Klasse.
1953 kam ich an das hum. Gymnasium Metten, das ich 1962 mit der Reifeprüfung abschloß.
Nach Ablegung meiner Pflichtwehrdienstzeit in Amberg und Munsterlager begann ich im Mai 1964 mein Medizinstudium an der Universität München, wo ich im Sommer 197o mein medizinisches Staatsexamen ablegte.
Meine Medizinalassistentenzeit machte ich am Städt. Krankenhaus Landshut und an der dermatologischen Universitätsklinik München.
Zur Zeit arbeite ich als Stationsarzt auf der inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Pfarrkirchen.